

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau



10/527666

(43) International publication date  
8 April 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) International publication number  
WO 2004/028564 A2

(51) International patent classification<sup>7</sup>:  
A61K 39/395, A61P 35/00, 33/00, 31/00

F-59650 Villeneuve d'Ascq (FR). BOUREL, Dominique [FR/FR]; 35, avenue Germaine, F-59110 La Madeleine (FR).

(21) International application number: PCT/FR2003/002714

(22) International filing date: 15 September 2003 (15.09.2003)

(74) Representatives: MARTIN Jean-Jacques, et al; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).

(25) Language of filing: French

(81) Designated states (*national*): AU, CA, IL, JP, US

(26) Language of publication: French

(84) Designated states (*regional*): European Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(30) Data relating to the priority:  
02/11,415 13 September 2002 (13.09.2002) FR  
02/11,416 13 September 2002 (13.09.2002) FR  
03/07,066 12 June 2003 (12.06.2003) FR

**Declaration under Rule 4.17:**

- *Of inventorship (Rule 4.17(iv)) for the following designation US.*

(71) Applicant (*for all designated States except US*):  
LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET  
DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'Activité de  
Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis (FR).

**Published:**

- *Without the International Search Report and to be republished once the report has been received.*

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*US only*): de ROMEUF, Christophe [FR/FR]; 116, rue de la Bassée, 59000 LILLE (FR). GAUCHER, Christine [FR/FR]; 32, rue des mésanges, 59320 Sequedin (FR). JORIEUX, Sylvie [FR/FR]; 17, rue Molière,

*For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.*

As printed

(54) Title: TREATMENT OF PATHOLOGIES WHICH ESCAPE THE IMMUNE RESPONSE, USING OPTIMISED ANTIBODIES

(54) Titre : TRAITEMENT DES PATHOLOGIES ECHAPPANT A LA REPOSE IMMUNE PAR DES ANTICORPS OPTIMISES

(57) **Abstract:** The invention relates to the use of optimised human or humanised chimeric monoclonal antibodies which are produced in selected cell lines, said antibodies having a strong affinity for receptor CD16 of the effector cells of the immune system and being able to induce the secretion of cytokines and interleukins, in particular 1' IFN $\gamma$  or 1' IL2, for the treatment of pathologies for which the target cells only express a low antigenic density and in which the effector cells can only be recruited in small quantities.

(57) **Abrégé :** La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains optimisés qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD 16 des cellules effectrices du système immunitaire mais également la propriété d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines, en particulier 1' IFN $\gamma$  ou 1' IL2 pour le traitement de pathologies pour lesquelles les cellules cibles n'expriment qu'une faible densité antigénique et dans lesquelles les cellules effectrices ne peuvent être recrutées qu'en faible quantité.

WO 2004/028564 A2

**Traitement des pathologies échappant à la réponse immune par des anticorps optimisés**

5 La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains optimisés qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD16 des cellules effectrices du système immunitaire mais également la propriété d'induire la  
10 traitement de pathologies pour lesquelles les cellules cibles n'expriment qu'une faible densité antigénique et dans lesquelles les cellules effectrices ne peuvent être recrutées qu'en faible quantité.

L'immunothérapie au moyen d'anticorps monoclonaux est en passe de devenir un des  
15 aspects les plus importants de la médecine. En revanche, les résultats obtenus lors d'essais cliniques apparaissent contrastés. En effet, il peut s'avérer que l'anticorps monoclonal ne soit pas suffisamment efficace. De nombreux essais cliniques sont arrêtés pour diverses causes telles que le manque d'efficacité et des effets secondaires incompatibles avec une utilisation en thérapie clinique. Ces deux aspects sont  
20 étroitement liés sachant que des anticorps peu actifs sont administrés à forte dose pour compenser et obtenir une réponse thérapeutique. L'administration de fortes doses induit non seulement des effets secondaires mais est économiquement peu viable.

Ces problèmes sont majeurs dans l'industrie des anticorps monoclonaux chimériques  
25 humanisés ou humains.

Or, ce problème est exacerbé pour un certain nombre de pathologies pour lesquelles la densité antigénique exprimée par les cellules cibles est faible et/ou le faible nombre de cellules effectrices disponibles et activées est limité, rendant ainsi techniquement  
30 impossible l'utilisation d'anticorps à visée thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles. Par exemple, dans le Syndrome de Sézary, l'antigène

spécifique, KIR3DL2, est faiblement exprimé (seulement environ 10 000 molécules). L'expression des antigènes tumoraux peut également être régulée négativement, comme HER2-neu dans le cancer du sein. Par ailleurs, lorsque l'on cherche à inhiber l'angiogénèse via le ciblage du VEGFR2, peu de cibles moléculaires sont effectivement accessibles car le récepteur est internalisé. De même, les peptides spécifiques d'antigènes de tumeurs présentés par les molécules HLA de classe 1 ou classe 2, par exemple dans le cas de carcinomes, mélanomes, cancers ovarien, cancers de la prostate sont généralement peu exprimés à la surface des cellules cibles tumorales. Enfin, une autre situation peut se trouver lors d'infections virales dans lesquelles les cellules infectées par certains virus (VHB, VHC, VIH) n'expriment que peu de molécules virales sur leur membrane.

Ce problème se pose aussi pour toutes les pathologies qui présentent une diminution du nombre de cellules NK, ou de leur activité ou de leur nombre de CD16 (Cavalcanti M et al, Irreversible cancer cell-induced functional anergy and apoptosis in resting and activated NK cells, Int J Oncol 1999 Feb;14(2):361-6). On peut citer à titre d'exemple, les leucémies myéloïdes chroniques (Parrado A. et al., Natural killer cytotoxicity and lymphocyte subpopulations in patients with acute leukaemia, Leuk Res 1994 Mar;18(3):191-7), les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles polychlorinés (Svensson BG. et al., Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds, Int Arch Occup Environ Health 1994;65(6):351-8), les maladies infectieuses, notamment la tuberculose (Restrepo LM. et al, Natural killer cell activity in patients with pulmonary tuberculosis and in healthy controls, Tubercle 1990 Jun;71(2):95-102), le syndrome de la fatigue chronique (CFS) (Whiteside TL, Friberg D, Natural killer cells and natural killer cell activity in chronic fatigue syndrome, Am J Med 1998 Sep 28;105(3A):27S-34S), et toutes les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules (Feldmeier H, et al, Relationship between intensity of infection and immunomodulation in human

schistosomiasis. II. NK cell activity and in vitro lymphocyte proliferation, Clin Exp Immunol 1985 May; 60(2):234-40).

- Ainsi, l'objectif est d'obtenir de nouveaux anticorps présentant une meilleure efficacité comparée aux anticorps actuels, ce qui permettrait d'envisager leur utilisation en 5  
thérapie pour les pathologies présentant peu de cibles moléculaires exprimées ou une faible densité antigénique ainsi qu'un nombre limité de cellules effectrices capables d'être activées.
- 10 Nous avons montré dans notre demande WO 01/77181 (LFB) l'importance de sélectionner des lignées cellulaires permettant de produire des anticorps présentant une forte activité ADCC via le FcγRIII (CD16). Nous avons trouvé que la modification de la glycosylation du fragment constant des anticorps produits dans des lignées de myélomes de rat telle que YB2/0 conduisait à améliorer l'activité ADCC. Les 15  
structures glycaniques desdits anticorps sont de type biantennées, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation.
- Or, dans le cadre de la présente invention, nous avons découvert que l'avantage de 20  
présenter une forte affinité pour le CD16 peut encore être renforcé par des conditions supplémentaires visant à produire des anticorps qui induisent également la production de cytokines, notamment la production d' IFN $\gamma$  ou l'IL2 par les cellules du système immunitaire.
- 25 Les deux caractéristiques précitées se complémentent. En effet, la production d' IFN $\gamma$  ou l'IL2 induite par les anticorps sélectionnés par le procédé de l'invention peut renforcer l'activité cytotoxique. Le mécanisme d'action d'une telle activation tient probablement à une régulation positive autocrine des cellules effectrices. On peut postuler que les anticorps se lient au CD16 provoquant une activité cytotoxique mais

également induisent la production de l' IFN $\gamma$  ou l'IL2 qui au final conduit à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.

5 Nous montrons ici que les anticorps optimisés de l'invention conservent une bonne efficacité même lorsque la densité antigénique est faible ou le nombre de cellules effectrices limité. Ainsi, à des doses compatibles avec une utilisation en thérapie clinique, il est désormais possible de traiter des pathologies pour lesquelles un traitement par anticorps n'était pas envisageable à ce jour.

10

### Description

Ainsi, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :

- 15 a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou  
b) la structure glycannique du Fc $\gamma$  a été modifiée ex vivo, et/ou  
c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;
- 20 ledit anticorps présentant i) un taux ADCC via le Fc $\gamma$ RIII (CD16) supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 100 % pour un ratio E/T (cellules effectrices/cellules cibles) inférieur à 5/1, de préférence inférieur à 2/1, comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ; et ii) un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100
- 25 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO;
- pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies pour lesquelles le nombre de sites antigéniques ou la densité antigénique sont faibles, les antigènes sont peu accessibles aux anticorps, ou encore pour lesquelles le nombre de
- 30 cellules effectrices activées ou recrutées est faible.

Avantageusement, le nombre de sites antigéniques est inférieur à 250 000, de préférence inférieur à 100 000 ou 50 000 par cellule cible.

- 5 Lesdites cytokines libérées par les anticorps optimisés sont choisies parmi des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

Ainsi, l'anticorps est sélectionné pour sa capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10,...

- 10 TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.

- De préférence, l'anticorps sélectionné présente la capacité d'induire la sécrétion d'IFN $\gamma$  ou d'IL2 par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 ou de l'IL2 par la cellule Jurkat CD16 pour un faible nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules cibles ou pour un faible nombre d'antigènes accessibles aux anticorps. Le taux IFN $\gamma$  ou d'IL2 sécrété reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction Fc) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène. En outre, la sécrétion d'IFN $\gamma$  ou d'IL2 par les cellules du système immunitaire peut activer l'activité cytotoxique des cellules effectrices. Ainsi, les anticorps de l'invention sont également utiles pour le traitement de pathologies pour lesquelles le nombre de cellules effectrices activées ou recrutées est faible.
- 15
- 20

- 25 Les cellules effectrices peuvent exprimer un CD16 endogène ou être transformées. On entend par cellule transformée, une cellule modifiée génétiquement de sorte à exprimer un récepteur, en particulier le récepteur CD16.

Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps de l'invention est capable d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine par une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages. De préférence, on utilise pour la sélection des anticorps une lignée Jurkat transfectée  
5 avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice. Cette lignée est particulièrement avantageuse car elle est immortalisée et se développe indéfiniment dans des milieux cultures. Le taux d'interleukine IL2 sécrétée reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction Fc) et à son efficacité (site antigénique) de liaison à l'antigène.

10

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps optimisé peut être préparé après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo par modification de la structure glycannique du fragment Fc. A cet effet, on peut utiliser tout moyen chimique, chromatographique ou enzymatique approprié pour modifier la structure glycannique des anticorps.

15

Dans un autre mode de réalisation, l'anticorps peut être produit par des cellules de lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivées. D'autres lignées peuvent être sélectionnées pour leurs propriétés de produire les anticorps définis ci-dessus. On pourra tester par exemple les cellules lymphoblastoïdes humaines, les  
20 cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines. La sélection peut également être appliquée à l'évaluation des anticorps produits par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques. A cet effet, la production dans CHO sert de référence (CHO étant employée pour la production d'anticorps médicament) pour comparer et sélectionner les systèmes de production conduisant aux anticorps selon l'invention.

25

La structure glycannique générale de l'anticorps correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation. Dans ces anticorps, le taux de GlcNAc intermédiaire est non nul.

30

Ainsi, l'invention vise l'utilisation d'un anticorps décrit ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sézary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomes.

10

**Légendes et titres des figures:**

Figure 1: ADCC sur hématies : comparaison hématies normales (N) versus hématies sur-exprimant l'antigène Rhésus (GR6) (Teg 500 µg / puits, ADCC 375 03 017)

Figure 2: Activité ADCC induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO ou YB2/0 en fonction du ratio E/T.

15

Figure 3: Influence du nombre d'antigènes HLA-DR exprimés sur Raji (blocage par Lym-1) sur l'activité ADCC induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO(carré) ou YB2/0 (triangle).

Figure 4: Influence du nombre d'antigènes HLA-DR exprimés sur Raji (blocage par Lym-1) sur l'activation de Jurkat CD16 (IL2) induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO(carré) ou YB2/0 (triangle).

20

Figure 5: Influence du nombre d'antigènes CD20 exprimés sur Raji (blocage par CAT 13) sur l'activation de Jurkat CD16.

Figure 6: Corrélation entre le test ADCC et la sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16.

Figure 7: IL8 sécrétée par les CMN en présence ou absence de cible

25

Figure 8: Sécrétion de cytokines par les CMN induite par les anticorps anti-Rhésus (valeur sans cible déduite) Tox 324 03 062

Figure 9: Sécrétion de cytokines par les polynucléaires induite par les anticorps anti Rhésus.

Figure 10: Sécrétion de cytokines par les NK induite par les anticorps anti-Rhésus

30



Figure 11: Sécrétion de TNF alpha par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA-DR exprimés dans CHO et YB2/0 (324 03 082).

Figure 12: Sécrétion d'IFN gamma par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA-DR exprimés dans CHO et YB2/0 (324 03 082).

5

**Exemple 1 : ADCC induit par des anticorps anti-Rhésus en fonction du nombre de sites antigéniques.**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène Rhésus D est  
10 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis des hématies Rhésus positif exprimant à leur surface différentes quantités d'antigène Rhésus, c'est à dire : hématies O+ normales (10-20 000 sites) et hématies sur-exprimant l'antigène rhésus (>60000 sites).

15 Les résultats sont présentés à la Figure 1 :

L'activité ADCC des anticorps exprimés dans CHO (triangle) ou YB2/0 (carré) sur des hématies normales (N, vide) ou sur-exprimant l'antigène Rhésus (GR6, plein) sont comparées.

20 La différence d'activité ADCC entre l'anticorps exprimé dans CHO et l'anticorps exprimé dans YB2/0 est moindre sur les hématies sur-exprimant l'antigène Rhésus surtout aux fortes quantités d'anticorps et augmente au fur et à mesure que le nombre de site antigénique décroît. Ainsi, plus la densité antigénique baisse, plus la différence d'activité ADCC entre l'anticorps produit dans YB2/0 et l'anticorps produit dans CHO  
25 augmente.

**Exemple 2 : ADCC induit par des anticorps anti-HLA DR en fonction de la quantité d'effecteurs**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est  
5 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis  
à vis de la cellule Raji en présence de différents ratios effecteurs/cibles (voir Figure 2).

La différence d'activité cytotoxique entre l'anticorps optimisé exprimé par YB2/0 et  
CHO s'accroît au fur et à mesure que le ratio E/T diminue. Ainsi, pour les ratios  
10 suivants, 20/1 ; 10/1 ; 5/1 ; et 2/1, le pourcentage relatif de lyse induit par l'anticorps  
exprimé dans CHO (100% étant la valeur de l'anticorps exprimé dans YB2/0 pour  
chaque ratio) est de 61%, 52%, 48% et 36% respectivement.

L'anticorps exprimé dans YB2/0 s'avère plus cytotoxique que lorsqu'il est produit par  
CHO dans des conditions de faibles quantités d'effecteurs.

15

**Exemple 3 : ADCC induit par des anticorps anti-HLA DR en fonction de la quantité d'antigènes accessibles**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est  
20 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis  
à vis de la cellule Raji en présence de différents ratios effecteurs/cibles (ratio E/T).

L'activité cytotoxique des anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont les  
sites antigéniques ont été préalablement bloqués avec des quantités croissantes d'un  
25 anticorps murin inactif (non cytotoxique) anti-HLA-DR, de façon à avoir un nombre  
décroissant d'antigènes HLA-DR disponibles vis à vis des anticorps à évaluer (voir  
Figure 3).

Moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence d'activité cytotoxique  
30 entre l'anticorps optimisé produit dans YB2/0 et l'anticorps produit dans CHO

augmente. Cela indique qu'une des applications de l'anticorps optimisé peut concerner des cellules cibles exprimant à leur surface un antigène peu exprimé reconnu par l'anticorps thérapeutique. Ceci procure un net avantage thérapeutique vis à vis d'un anticorps exprimé dans une cellule de type CHO.

5

**Exemple 4 : Production d'IL2 par Jurkat CD16 induite par des anticorps anti-HLA DR en fonction de la quantité d'antigènes accessibles**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène HLA-DR est  
10 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activation de la cellule effectrice (sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16) induite par les anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont les sites antigéniques ont été préalablement bloqués avec des quantités croissantes d'un anticorps murin anti-HLA-DR, de façon à avoir un nombre décroissant d'antigène HLA-DR disponible vis à vis des anticorps à évaluer (voir Figure 4).

15

Ces résultats montrent également que moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence d'activation des cellules effectrices entre l'anticorps optimisé produit par YB2/0 et l'anticorps produit dans CHO augmente.

20 **Exemple 5 : ADCC induit par des anticorps anti-CD20 en fonction de la quantité d'antigènes.**

Les résultats obtenus avec l'anti-CD20 en ADCC confirment ceux obtenus avec les anti-HLADR, c'est à dire que moins il y a de sites antigéniques disponibles et exprimés  
25 à la surface des cellules cibles, plus la différence d'activation des cellules effectrices entre l'anticorps optimisé produit par YB2/0 et l'anticorps produit dans CHO augmente.

30

**Exemple 6 : Production d'IL2 par Jurkat CD16 induite par des anticorps anti-CD20 en fonction de la quantité d'antigènes accessibles**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène CD20 est  
5 transfectée dans CHO et YB2/0. L'activation de la cellule effectrice (sécrétion d'IL2  
par Jurkat CD16) induite par les anticorps est comparée vis à vis de cellules Raji dont  
les sites antigéniques ont été préalablement bloqués avec des quantités croissantes d'un  
anticorps murin inactif anti-CD20, de façon à avoir un nombre décroissant d'antigène  
CD20 disponibles vis à vis des anticorps à évaluer (voir Figure 5).

10

Moins il y a de sites antigéniques disponibles, plus la différence d'activation des  
cellules Jurkat CD16 induite par l'anticorps optimisé produit par YB2/0 et l'anticorps  
produit dans CHO augmente. Cela indique qu'une cellule exprimant une faible densité  
antigénique peut néanmoins induire l'activation d'une cellule effectrice via un  
15 anticorps optimisé. Cette capacité est beaucoup plus restreinte voire nulle avec un  
anticorps exprimé dans CHO.

Les applications thérapeutiques de l'anticorps optimisé c'est à dire produit dans  
YB2/0, peuvent ainsi concerner des cellules cibles exprimant à leur surface un antigène  
peu exprimé.

20

En conclusion, les anticorps optimisés s'avèrent particulièrement utiles pour des  
applications thérapeutiques lorsque les cellules cibles expriment à leur surface peu  
d'antigènes, et ceci quel que soit l'antigène.

25 **Exemple 7 : Corrélation in vitro entre ADCC et libération d'IL-2 par la cellule  
Jurkat CD16.**

Pour cette étude, 3 anticorps monoclonaux anti-D ont été comparés.

L'anticorps monoclonal (Mab) DF5-EBV a été produit par des Lymphocytes B humain  
30 obtenus chez un donneur immunisé D-négatif et immortalisés par transformation avec

l'EBV. Cet anticorps a été utilisé comme contrôle négatif étant donné que lors d'un essai clinique, il s'est montré incapable d'éliminer les globules rouges Rhésus positif de la circulation.

5 L'anticorps monoclonal (Mab) DF5-YB2/0 a été obtenu en exprimant la séquence primaire de DF5-EBV dans la lignée YB2/0. L'anticorps monoclonal R297 et d'autres anticorps recombinants ont également été exprimés dans YB2/0.

10 Les anticorps sont testés in vitro pour leur capacité à induire une lyse des globules rouges traités à la papaïne en utilisant des cellules mononucléées (PBL) comme effecteur.

Tous les tests ont été effectués en présence d'immunoglobulines humaines (IVIg) de sorte à reconstituer les conditions physiologiques.

15 On pense que les IVIg se lient avec une haute affinité au FcγRI (CD64). Les deux Mab DF5-YB2/0 et R297 induisent une lyse des globules rouges à un niveau comparable à celui des anticorps polyclonaux WinRho. En revanche, le Mab DF5-EBV est complètement inefficace.

20 Dans une deuxième série d'expérience, des cellules NK purifiées et des globules rouges non traités ont été utilisés comme effecteurs et cibles respectivement. Après 5 heures d'incubation, les Mabs antiD-R297 et DF5-YB2/0 se sont montrés capables de provoquer la lyse des globules rouges, alors que DF5-EBV reste inefficace.

Dans ces deux expériences, la lyse des globules rouges a été inhibée par le Mab 3G8 dirigé contre le FcγRIII (CD16).

25 En résumé, ces résultats démontrent que l'ADCC provoquée par le Mab R297 et le Mab DF5-YB2/0 implique le FcγRIII exprimé à la surface des cellules NK.

30 Dans le cadre de l'invention, une troisième série d'expériences a été réalisée en utilisant un test in vitro à l'aide des cellules Jurkat CD16 pour évaluer l'efficacité d'anticorps anti-D. Les Mab ont été incubés pendant la nuit avec des globules rouges

Rhésus positif et des cellules Jurkat CD16. La libération d'IL-2 dans les surnageants a été évaluée par ELISA.

Une forte corrélation entre l'ADCC et l'activation des cellules Jurkat (production d'IL2) a été observée, ce qui implique que ce test peut être utilisé pour faire la discrimination des Mabs anti-D en fonction de leur réactivité envers FcgammaRIII (CD16).

Les mêmes échantillons sont évalués en ADCC et dans le test Jurkat IL2. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'anticorps de référence "anti-D R297". La courbe de corrélation entre les 2 techniques a un coefficient  $r^2=0.9658$  (figure 6).

En conclusion, ces données montrent l'importance des modifications post-traductionnelles de la structure des anticorps et leur impact sur l'activité ADCC spécifique du FcgammaRIII (CD16). La libération de cytokines telles que IL-2 par les cellules Jurkat CD16 reflète cette activité.

#### **Exemple 8 : activation de cellules NK et production d'IL2 et d'IFN $\gamma$**

Modèle de mise au point : lignée cellulaire Jurkat transfectée avec le gène codant pour le récepteur CD16. Applications : renforcement d'une réponse anti-tumorale. L'IL2, produite par les cellules effectrices activées par des immuns complexes antigène-anticorps, induit une activation des lymphocytes T et des cellules NK pouvant aller jusqu'à une stimulation de la prolifération cellulaire. L'IFN $\gamma$  stimule l'activité des CTLs et peut renforcer l'activité des macrophages.

#### **Exemple 9 : activation de monocytes macrophages et production de TNF et d'IL-1Ra**

Applications : renforcement de la phagocytose et induction de propriétés anti-inflammatoires. Le TNF, produit par les cellules effectrices activées par des immuns

complexes antigène-anticorps, stimule la prolifération des macrophages et des lymphocytes infiltrant les tumeurs. L'IL-1Ra est une cytokine qui entre en compétition avec l'IL1 au niveau de son récepteur et exerce ainsi un effet anti-inflammatoire.

**5 Exemple 10 : activation de cellules dendritiques et production d'IL10**

Applications : induction d'une tolérance spécifique à certains antigènes. L'IL10 est une molécule inhibitrice de l'activation de différentes cellules effectrices et de la production de cytokines. Ainsi l'IL10 produite par les cellules effectrices activées par  
10 des immuns complexes antigène-anticorps peut avoir un rôle régulateur de l'activité cytotoxique des anticorps vis à vis de cellules normales, mais exprimant des antigènes communs avec les cellules cibles visées, et également moduler les effets du TNF alpha.

**15 Exemple 11 : Induction de la sécrétion de cytokines par différentes cellules effectrices.**

Trois populations cellulaires ont été étudiées : les polynucléaires, les cellules mononuclées et les cellules NK. L'induction de la synthèse de cytokines par des anticorps est dépendante de la présence de la cible. Il y a peu de différences dans la  
20 capacité de l'anticorps anti-D R297 et de l'anticorps polyclonal à induire la production de différentes cytokines. Par contre, AD1 est très souvent non inducteur de sécrétion de cytokines.

**Résultats :**

11.1 L'anticorps monoclonal R297 et l'anticorps polyclonal WinRho induisent une  
25 sécrétion importante d'IL8 en présence de cellules mononuclées. Cette sécrétion est dépendante de la concentration d'anticorps et de la présence de la cible antigénique, c'est à dire des hématies Rh positif. L'anticorps AD1 est beaucoup moins apte à induire la production d'IL8 (figure 7).

En présence de cellules mononucléées et d'hématies Rhésus positif, l'anticorps monoclonal R297 et l'anticorps polyclonal anti-D WinRho induisent une sécrétion importante de TNF alpha, moins forte bien que supérieure à celles induites par AD1 d'IL6, d'IFN gamma, d'IP10, de TNF alpha et TGF Beta. En présence de plus forte concentration d'anticorps, la sécrétion d'IL6, d'IFN gamma, d'IP10 augmente, mais celle de TNF alpha et le TGF Beta décroît (figure 8).

11.2 L'anticorps monoclonal R297 et l'anticorps polyclonal anti-D WinRho induisent une sécrétion très faible, mais supérieure à AD1, d'IL2, d'IFN gamma, d'IP10 et de TNF par les polynucléaires. Cette sécrétion est dépendante de la concentration d'anticorps (figure 9).

11.3 L'anticorps monoclonal R297 et l'anticorps polyclonal anti-D WinRho induisent une sécrétion importante d'IFN gamma, d'IP10 et de TNF par les cellules NK. Cette sécrétion est dépendante de la concentration d'anticorps (figure 10).

## **Exemple 11 : Anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques optimisés produits dans YB2/0**

### **Introduction**

Nos premiers résultats ont montré que les anticorps anti-D produits dans YB2/0 ainsi que les anticorps polyclonaux utilisés en clinique induisaient la production de cytokines, en particulier de TNF alpha et d'interféron gamma (IFN gamma) à partir de cellules NK purifiées ou de cellules mononucléées. Par contre d'autres anticorps anti-D, produits dans d'autres lignées cellulaires sont négatifs en ADCC et se sont révélés incapables d'induire une sécrétion de cytokines.

Les résultats complémentaires ci dessous montrent que ce mécanisme n'est pas exclusif aux anti-D en présence d'hématies Rhésus positif mais s'applique également aux anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans YB2/0. L'expression dans



CHO confère à l'anticorps des propriétés activatrices moins importantes. Ceci est en corrélation avec les résultats obtenus en ADCC.

### **Matériel**

#### **5    *Anticorps.***

Anti-CD20 : l'anticorps chimérique anti-CD20 transfecté dans YB2/0 est comparé à un anticorps commercial anti-CD20 produit dans CHO (Rituxan).

Anti-HLA DR : la même séquence codant pour l'anticorps chimérique anti-HLA DR est transfectée dans CHO (B11) ou YB2/0 (4B7).

- 10    *Cellules cibles*** : cellules Raji exprimant à leur surface l'antigène CD20 et HLA-DR  
*Cellule effectrices* : cellules NK humaines purifiées par sélection négative à partir de poche de sang humain.

### **Méthode**

- 15**Différentes concentrations d'anticorps anti-CD20 ou anti-HLA DR sont incubées avec les cellules Raji et les cellules NK. Après 16 heures d'incubation, les cellules sont centrifugées. Les surnageants sont dosés en TNF alpha et en IFN gamma.

### **Résultats :**

**20**

*1) TNF alpha* : Les résultats sont exprimés en pg/ml de TNF alpha dosé dans les surnageants. En abscisse figurent les différentes concentrations d'anticorps ajoutées dans le mélange réactionnel (figure 11).

- 25**Les anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques produits dans YB2/0 induisent des taux plus importants de TNF en présence de leur cible (Raji) par rapport aux mêmes anticorps produits dans CHO. La quantité de TNF alpha est bien dose dépendante de la concentration d'anticorps ajouté. A 10ng/ml d'anticorps on induit 5 fois plus de TNF alpha avec les anticorps produits dans YB2/0 par rapport aux
- 30**anticorps produits dans CHO.

2) *IFN gamma*: Les résultats sont exprimés en pg/ml d'IFN gamma dosé dans les surnageants. En abscisse figurent les différentes concentrations d'anticorps ajoutées dans le mélange réactionnel (figure 12).

5

Les anticorps anti-CD 20 et anti-HLA DR chimériques produits dans YB2/0 induisent des taux plus importants d' IFN gamma en présence de leur cible (Raji) par rapport aux mêmes anticorps produits dans CHO. La quantité d'IFN gamma est bien dose dépendante de la concentration d'anticorps ajouté. A toutes les concentrations utilisées  
10 (10 à 200ng/ml) l'anticorps anti-HLA DR produit dans CHO n'induit pas de sécrétion d'IFN gamma, alors que 40ng/ml de l'anticorps produit dans YB2/0 induit environ 1000pg/ml d'IFN gamma.

Pour l'anticorps anti-CD20, il faut pour induire 300pg/ml d'IFN gamma moins de  
15 10ng/ml de l'anticorps produit dans YB2/0 et 200ng/ml de l'anticorps produit dans CHO (figure 12).

### REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :
- a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou
- b) la structure glycanique du Fc $\gamma$  a été modifiée ex vivo, et/ou
- 10 c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;
- ledit anticorps présentant i) un taux d'ADCC dépendant du Fc $\gamma$ RIII (CD16) supérieur à 50 %, de préférence supérieur à 100 % pour un ratio E/T (cellules effectrices/cellules cibles) inférieur à 5/1, de préférence inférieur à 2/1, comparé au même anticorps
- 15 produit dans une lignée CHO ; et ii) un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice de type Jurkat CD16 ou issue du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO;
- pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies pour
- 20 lesquelles le nombre de sites antigéniques, la densité antigénique sont faibles ou les antigènes sont peu accessibles aux anticorps, ou encore pour lesquelles le nombre de cellules effectrices activées ou recrutées est limité.
2. Utilisation selon la revendication 1 caractérisée en ce que le nombre de sites
- 25 antigéniques est inférieur à 250 000, de préférence inférieur à 100 000 ou 50 000 par cellule cible.
3. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que lesdites cytokines libérées par les anticorps optimisés sont choisies parmi des interleukines, des
- 30 interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé induit la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10,... TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire en particulier celles exprimant le récepteur CD16.
- 5
5. Utilisation selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisée en ce que l'anticorps induit la sécrétion d'IL-2 par la cellule Jurkat CD16 ou d' IFN $\gamma$  et d'IL2 par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 pour un faible nombre de sites antigéniques présents à la surface des cellules cibles ou pour un faible nombre d'antigènes accessibles aux anticorps ou pour un faible nombre de cellules effectrices.
- 10
6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la cellule effectrice est une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou une cellule du groupe monocytes-macrophages.
- 15
7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que la cellule effectrice est une cellule Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16.
- 20
8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé est préparé après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo par modification de la structure glycannique du fragment Fc.
- 25
9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé est produit par des cellules de lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivés.

10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé présente une structure glycanique générale de type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation.

5

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que l'anticorps optimisé présente un taux de GlcNAc intermédiaire non nul.

10 12. Utilisation d'un anticorps selon l'une des revendications 1 à 11 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une pathologie choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau-né, le Syndrome de Sézary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphényles polychlorinés, les maladies infectieuses,  
15 notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules.

1 / 10

ADCC sur hématies : comparaison hématies normales(N) versus hématies sur-exprimant l'antigène Rhésus (GR6).  
(Teg 500µg/puits, ADC 375 03 017)

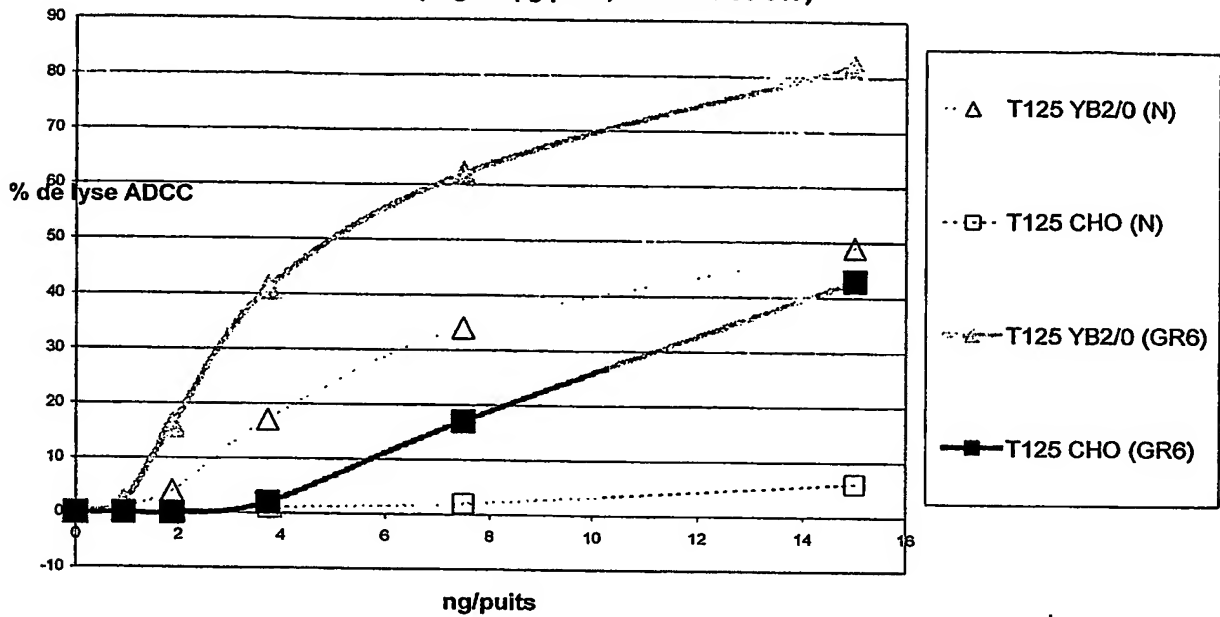


FIGURE 1

Activité ADCC induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO ou YB2/0 en fonction du ratio E/T.

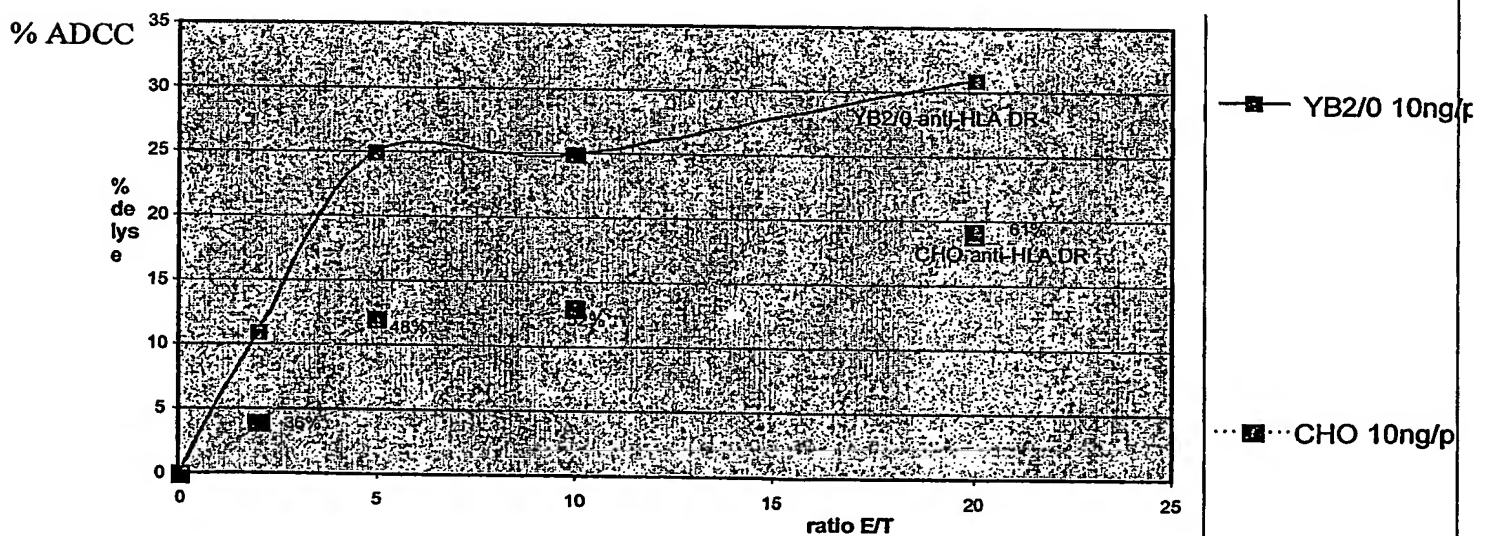


FIGURE 2

2 / 10

Influence du nombre d'antigènes HLA-DR exprimés sur Raji (blocage par Lym-1) sur l'activité ADCC induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO(carré) ou YB2/0 (triangle).

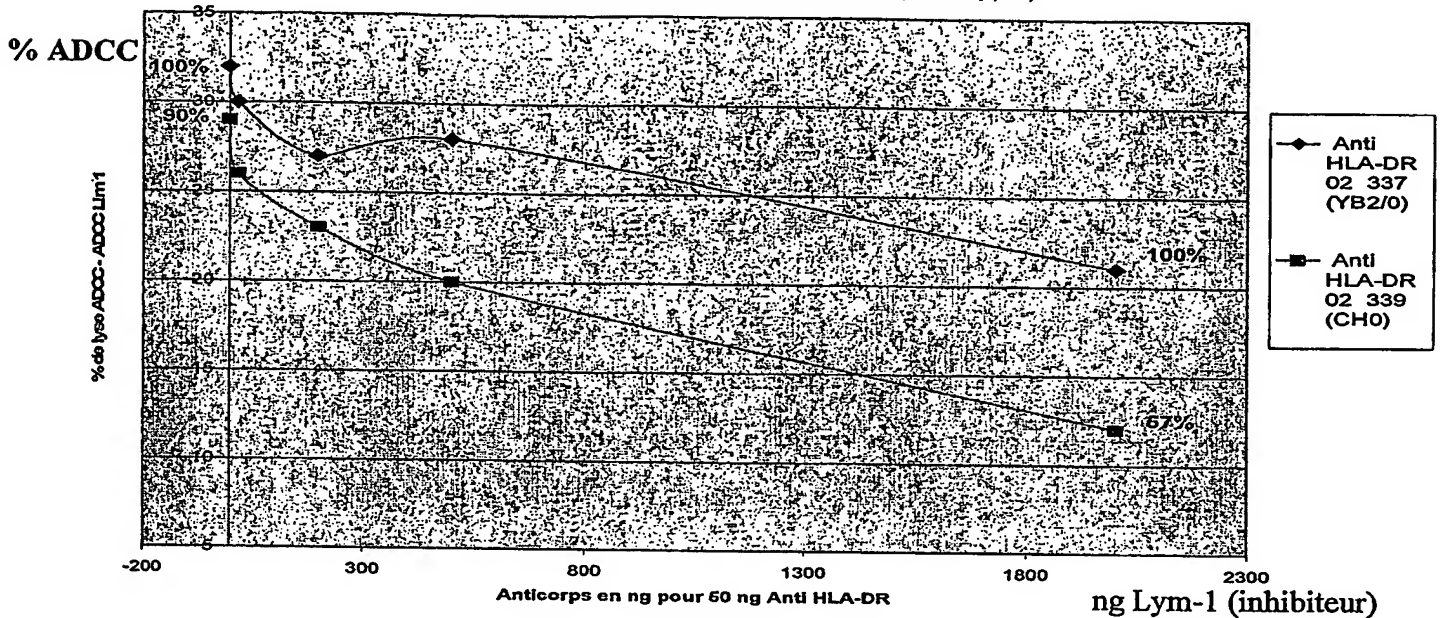


FIGURE 3

Influence du nombre d'antigènes HLA-DR exprimés sur Raji (blocage par Lym-1) sur l'activation de Jurkat CD16 (IL2) induite par les anticorps chimériques anti-HLA-DR exprimés dans CHO(carré) ou YB2/0 (triangle).

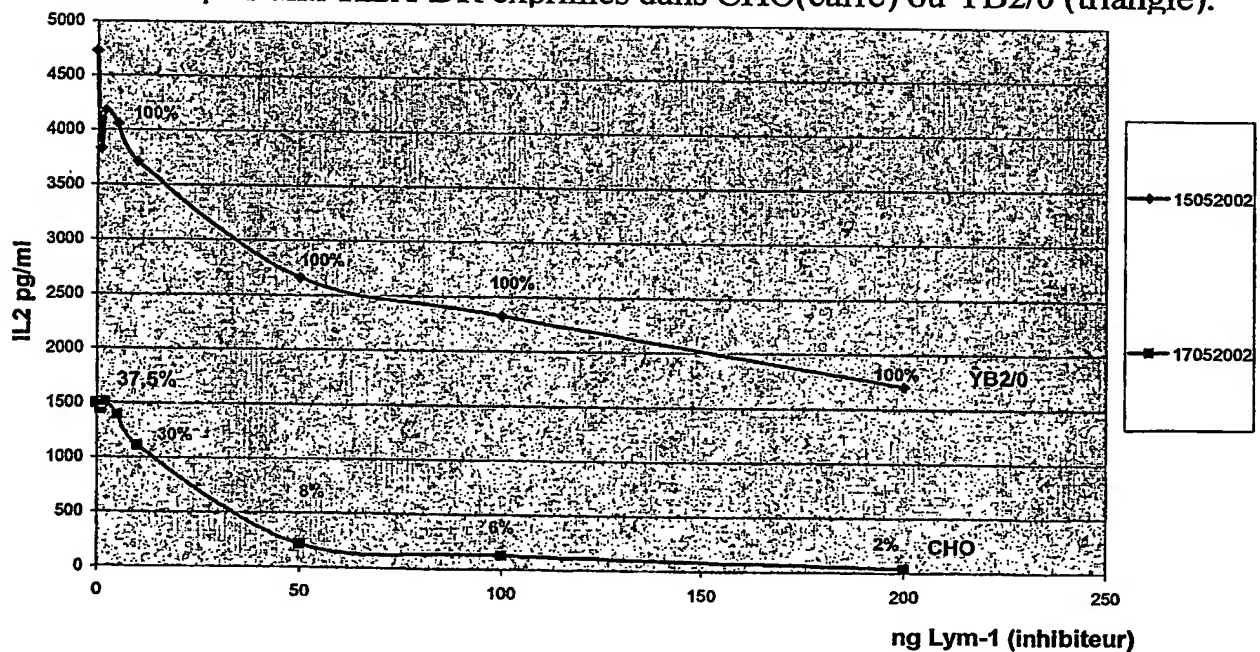


FIGURE 4

3 / 10

Influence du nombre d'antigènes CD20 exprimés sur Raji (blocage par CAT 13) sur  
l'activation de Jurkat CD16

TOX 324 03/069

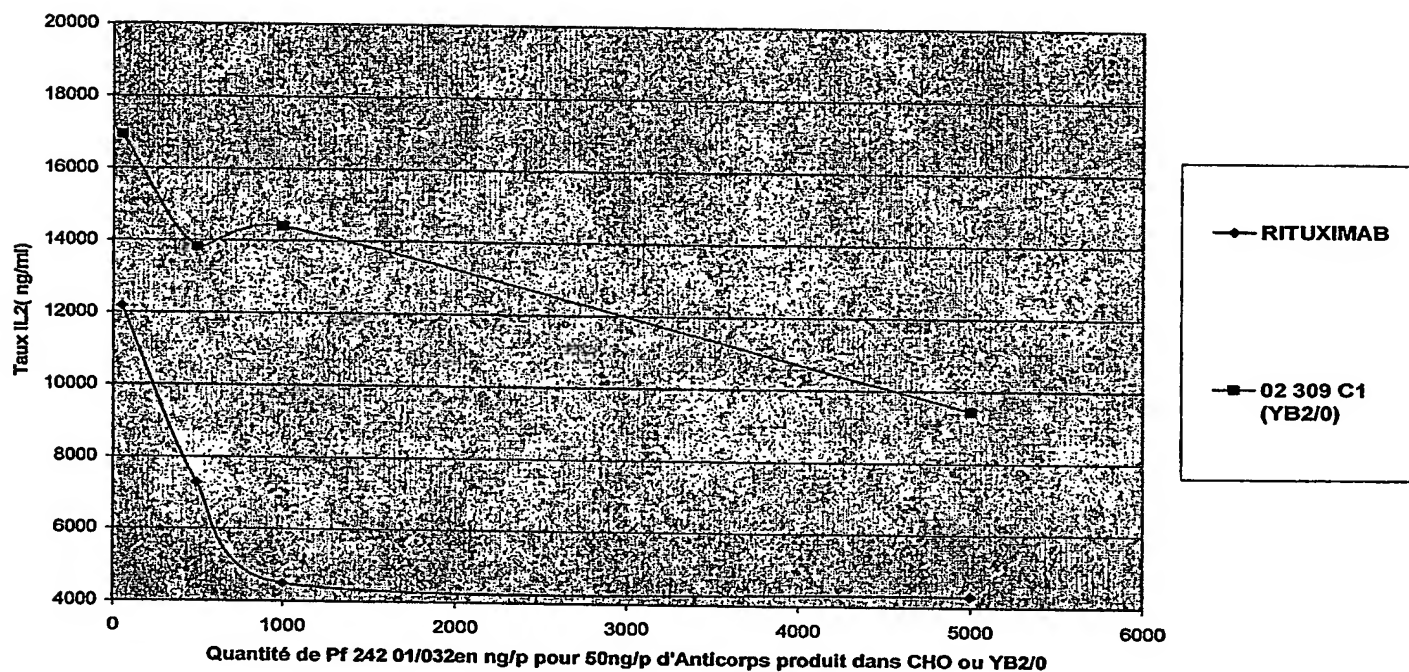


FIGURE 5



4 / 10

Corrélation entre le test ADCC et la sécrétion d'IL2 par Jurkat CD16.

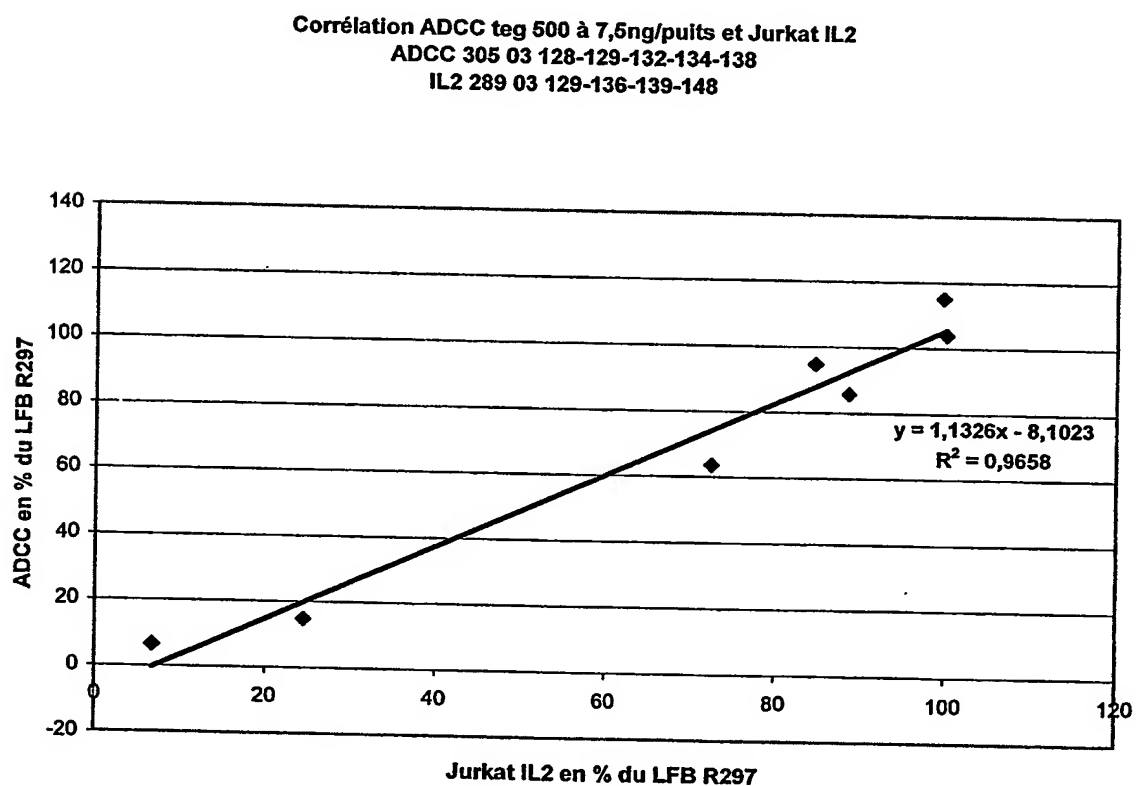


FIGURE 6

5 / 10

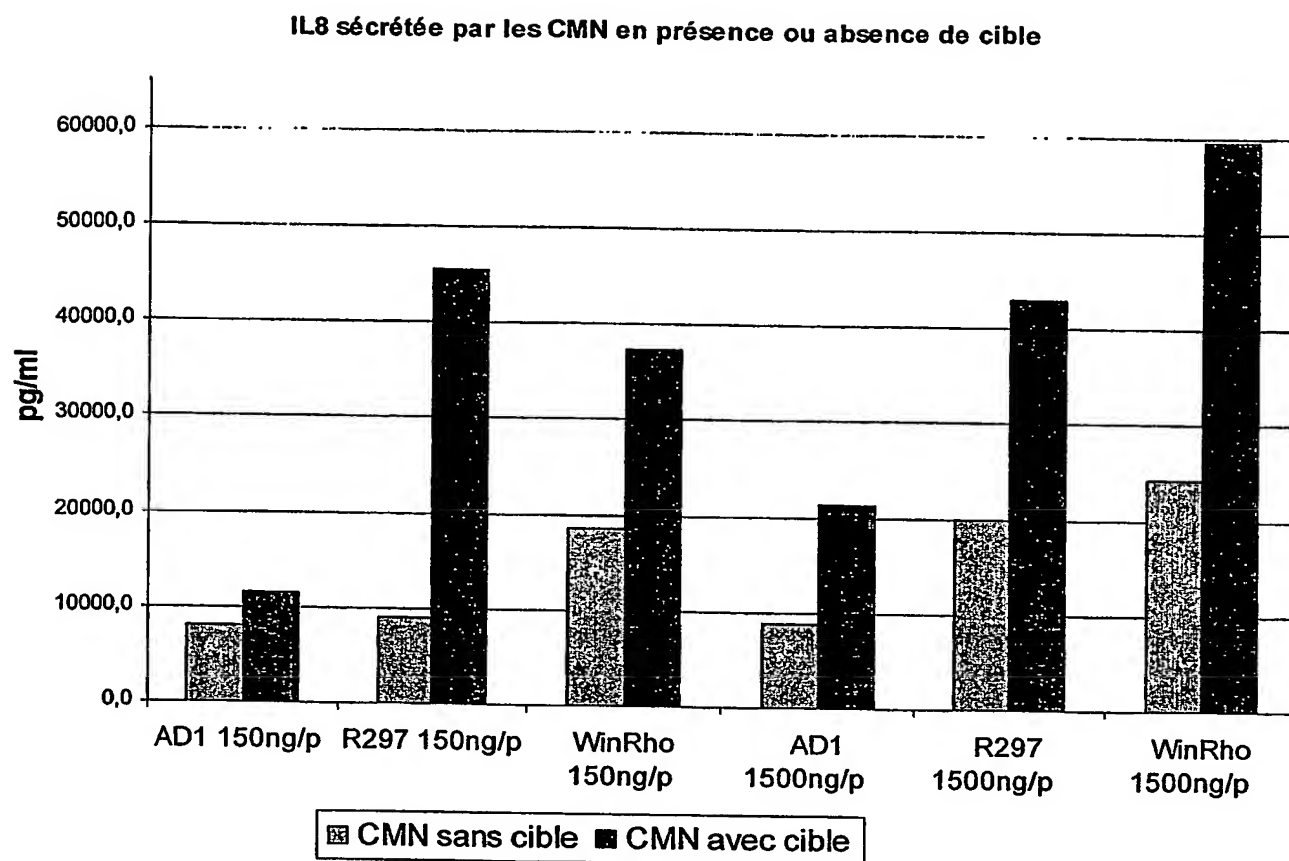


FIGURE 7

6 / 10

Secrétion de cytokines par les CMN induite par les anticorps anti-Rhésus  
(valeur sans cible déduite)

Tox 324 03 062

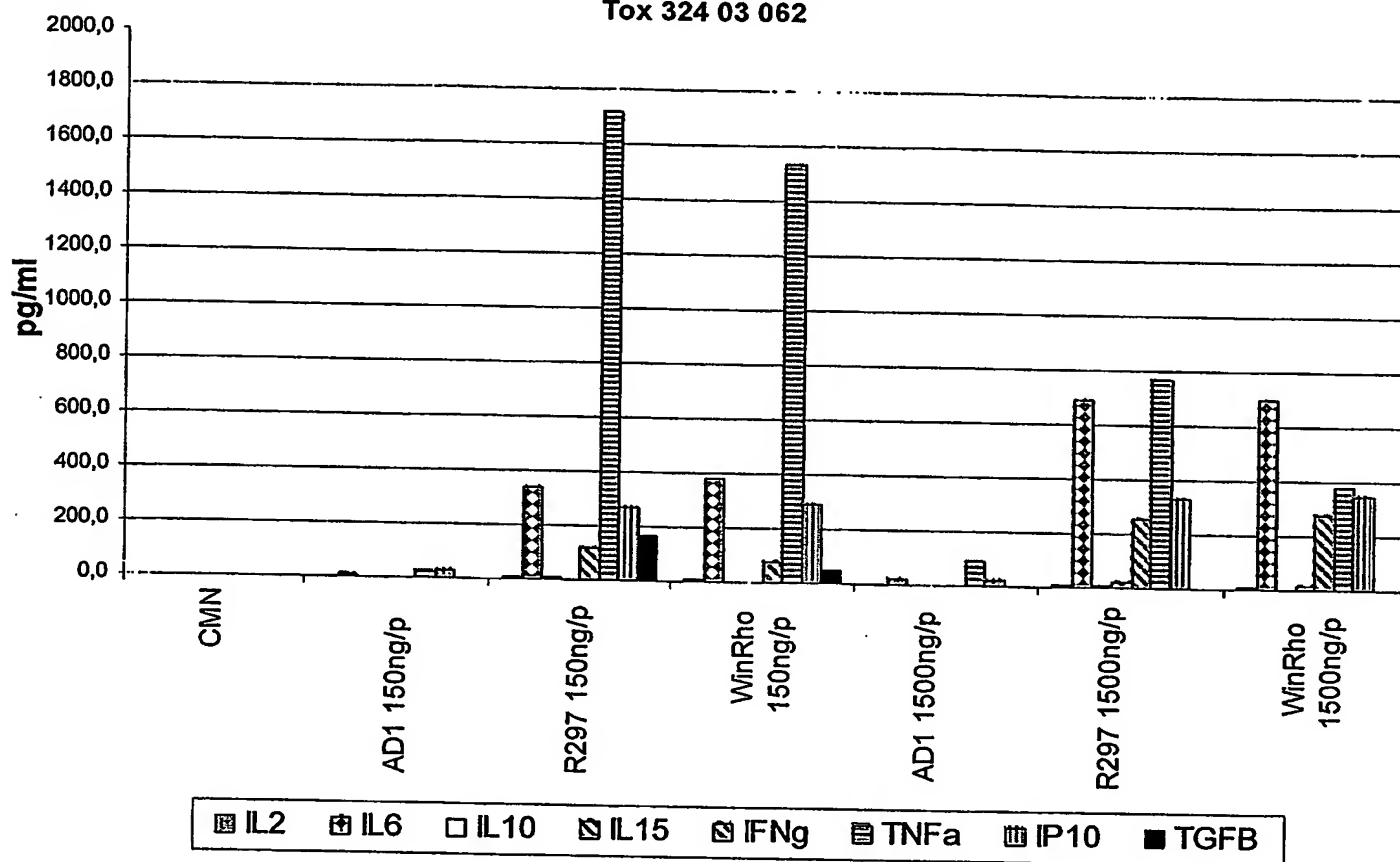


FIGURE 8

7 / 10

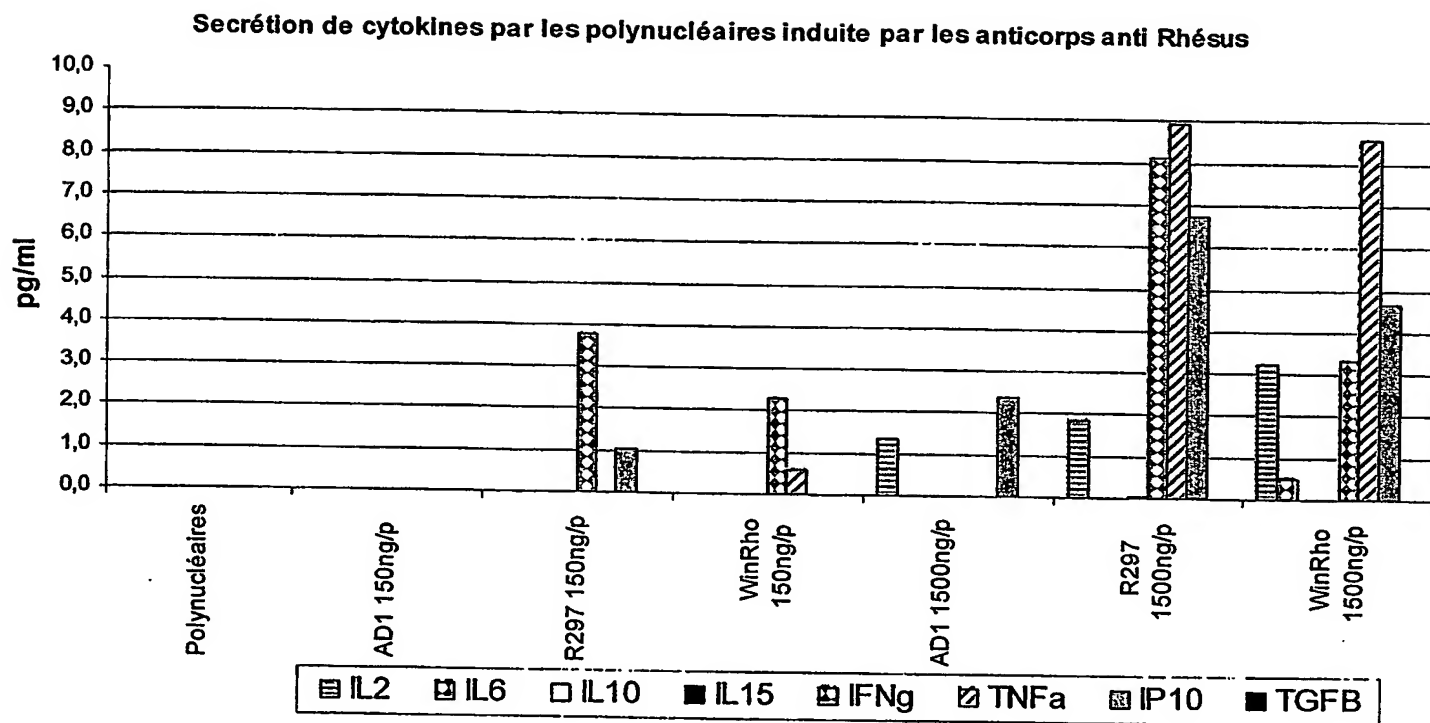


FIGURE 9

8 / 10

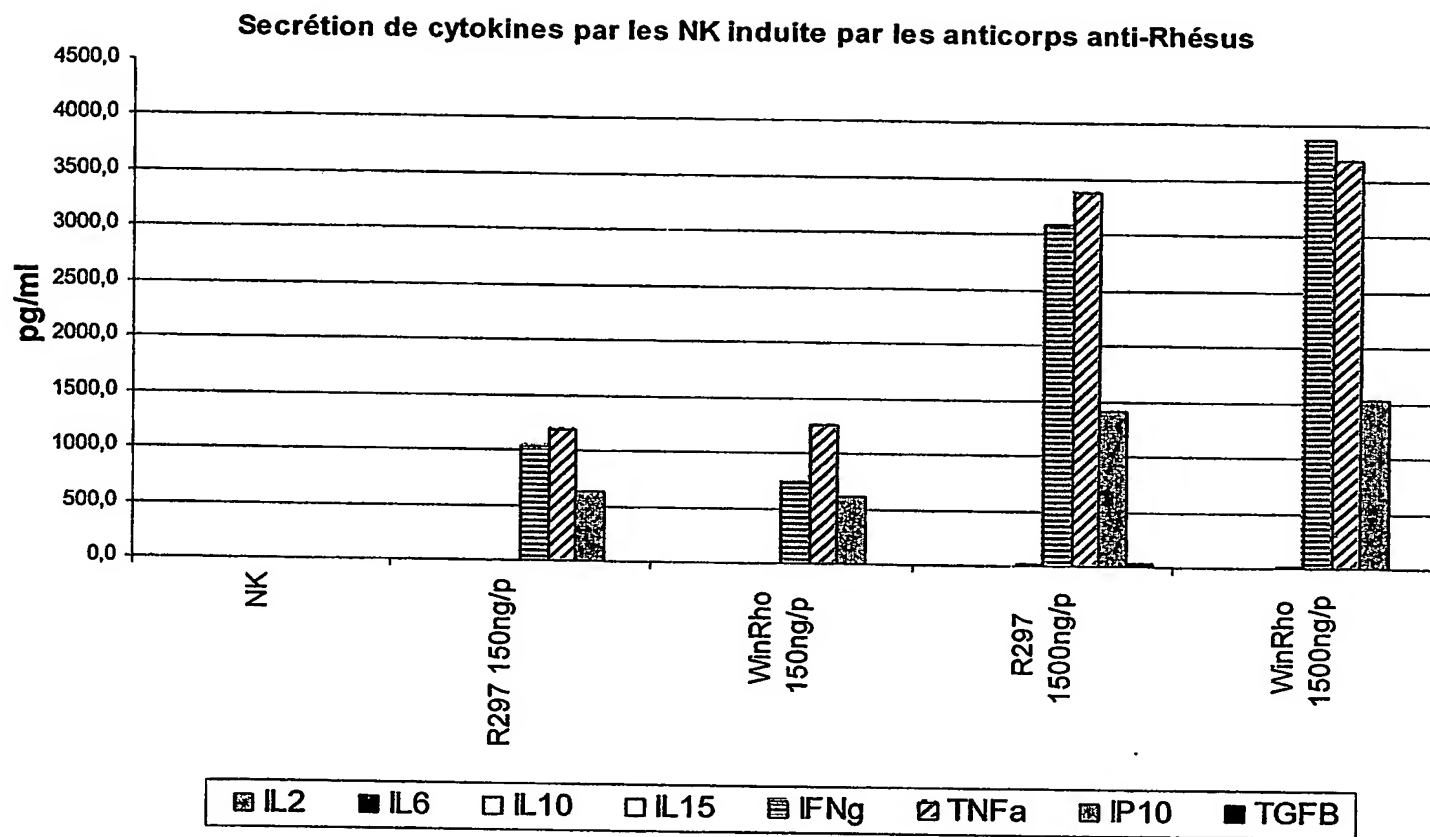


FIGURE 10

9 / 10

Sécrétion de TNF alpha par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans CHO et YB2/O (324 03 082)

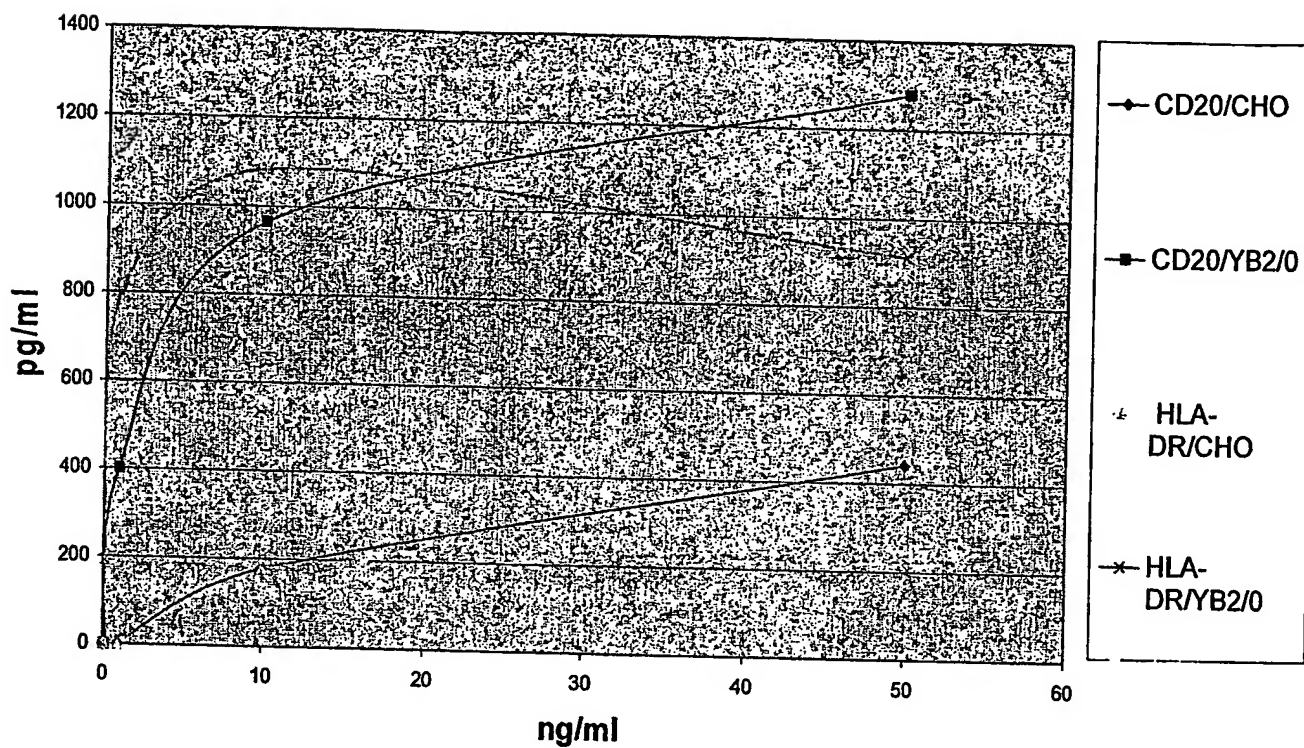


FIGURE 11

10 / 10

Sécrétion d'IFN gamma par les cellules NK, induite par les anticorps anti-CD20 et anti-HLA DR exprimés dans CHO et YB2/0 (324 03 082)

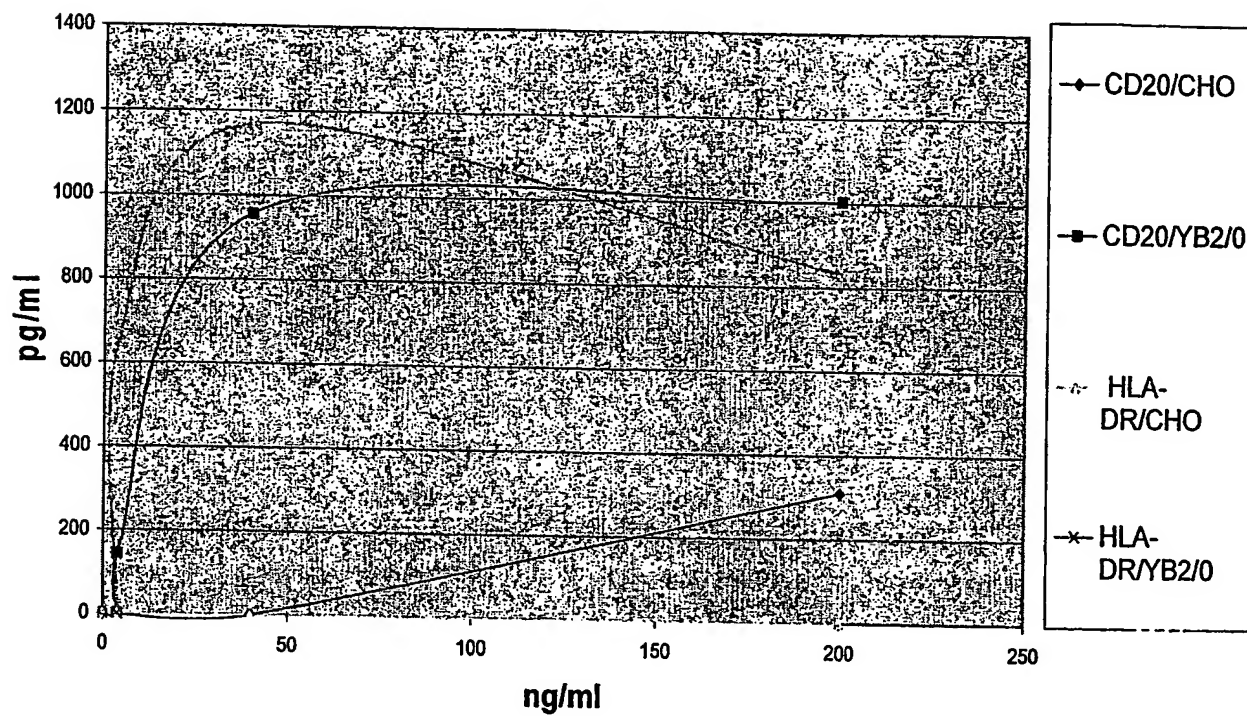


FIGURE 12

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



10/527666



(43) Date de la publication internationale  
8 avril 2004 (08.04.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/028564 A3

- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
A61K 39/395, A61P 35/00, 33/00, 31/00, C07K 16/00  
d'Ascq (FR). BOUREL, Dominique [FR/FR]; 35, avenue  
Germaine, F-59110 La Madeleine (FR).
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002714  
(74) Mandataires : MARTIN Jean-Jacques etc.; Cabinet  
Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17  
(FR).
- (22) Date de dépôt international :  
15 septembre 2003 (15.09.2003)  
(81) États désignés (national) : AU, CA, IL, JP, US.
- (25) Langue de dépôt : français  
(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FR, GB, GR, HU, IE, IT,  
LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
0211415 13 septembre 2002 (13.09.2002) FR  
0211416 13 septembre 2002 (13.09.2002) FR  
0307066 12 juin 2003 (12.06.2003) FR  
Déclaration en vertu de la règle 4.17 :  
— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : LABO-  
RATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET  
DES BIOTECHNOLOGIES [FR/FR]; Zone d'Activité de  
Courtaboeuf, 3, avenue des Tropiques, F-91940 Les Ulis  
(FR).  
Publiée :  
— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues
- (72) Inventeurs; et  
(73) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : de  
ROMEUF, Christophe [FR/FR]; 116, rue de la Bassée,  
59000 LILLE (FR). GAUCHER, Christine [FR/FR];  
32, rue des mésanges, 59320 Sequedin (FR). JORIEUX,  
Sylvie [FR/FR]; 17, rue Molière, F-59650 Villeneuve  
(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 30 septembre 2004  
En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: TREATMENT OF PATHOLOGIES WHICH ESCAPE THE IMMUNE RESPONSE, USING OPTIMISED ANTIBODIES

(54) Titre : TRAITEMENT DES PATHOLOGIES ECHAPPANT A LA REPOSE IMMUNE PAR DES ANTICORPS OPTIMISES

(57) Abstract: The invention relates to the use of optimised human or humanised chimeric monoclonal antibodies which are produced in selected cell lines, said antibodies having a strong affinity for receptor CD16 of the effector cells of the immune system and being able to induce the secretion of cytokines and interleukins, in particular 1' IFN $\gamma$  or 1' TL2, for the treatment of pathologies for which the target cells only express a low antigenic density and in which the effector cells can only be recruited in small quantities.

(57) Abrégé : La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains optimisés qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte affinité pour le récepteur CD 16 des cellules effectrices du système immunitaire mais également la propriété d'induire la sécrétion de cytokines et d'interleukines, en particulier l' IFN $\gamma$  ou l' TL2 pour le traitement de pathologies pour lesquelles les cellules cibles n'expriment qu'une faible densité antigénique et dans lesquelles les cellules effectrices ne peuvent être recrutées qu'en faible quantité.

WO 2004/028564 A3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

03/02714

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K16/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00 A61P33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/77181 A1 (GLACET ARNAUD ET AL) 18 October 2001 (2001-10-18) page 35, line 23 - page 37, line 14; claims 1-32	1-12
A	----- WRIGHT A ET AL: "Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 15, no. 1, 1997, pages 26-32, XP004016809 ISSN: 0167-7799 the whole document ----- -/--	1-12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 August 2004

Date of mailing of the international search report

24/08/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

03/02714

## G.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIELDS R L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 277, no. 30, 26 July 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002964542 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-12
A	CARTRON GUILLAUME ET AL: "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene" BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 602a, XP001193741 & 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001 ISSN: 0006-4971 the whole document	1-12
A	US 6 180 377 B1 (BODMER MARK WILLIAM ET AL) 30 January 2001 (2001-01-30) column 1	1-12
A	VIDOVIC D ET AL: "SELECTIVE APOPTOSIS OF NEOPLASTIC CELLS BY THE HLA-DR-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY" CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 128, no. 2, 19 June 1998 (1998-06-19), pages 127-135, XP000857331 ISSN: 0304-3835 page 134, left-hand column	1-12

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

03/02714

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 5, 31 January 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002965857 ISSN: 0021-9258 page 3466, left-hand column page 3471, left-hand column, last paragraph - page 3473, left-hand column, paragraph 1</p> <p>-----</p>	1-12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/03/02714

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0177181	A1	18-10-2001	FR 2807767 A1	19-10-2001
			AU 5485801 A	23-10-2001
			CA 2406033 A1	18-10-2001
			EP 1272527 A2	08-01-2003
			WO 0177181 A2	18-10-2001
			JP 2003534781 T	25-11-2003
			US 2003175969 A1	18-09-2003
US 6180377	B1	30-01-2001	AT 208820 T	15-11-2001
			AU 691811 B2	28-05-1998
			AU 6934194 A	03-01-1995
			AU 694926 B2	06-08-1998
			AU 6934294 A	03-01-1995
			CA 2163344 A1	22-12-1994
			CA 2163345 A1	22-12-1994
			DE 69429095 D1	20-12-2001
			DE 69429095 T2	12-09-2002
			EP 0714409 A1	05-06-1996
			EP 0715653 A1	12-06-1996
			WO 9429351 A2	22-12-1994
			WO 9429451 A2	22-12-1994
			JP 8511420 T	03-12-1996
			JP 8511421 T	03-12-1996

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde internationale No  
03/02714

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07K16/00 A61K39/395 A61P35/00 A61P31/00 A61P33/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 01/77181 A1 (GLACET ARNAUD ET AL) 18 octobre 2001 (2001-10-18) page 35, ligne 23 - page 37, ligne 14; revendications 1-32	1-12
A	WRIGHT A ET AL: "Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 15, no. 1, 1997, pages 26-32, XP004016809 ISSN: 0167-7799 le document en entier	1-12

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

12 août 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

24/08/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Flao, K

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>SHIELDS R L ET AL: "Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity"</p> <p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US,</p> <p>vol. 277, no. 30,</p> <p>26 juillet 2002 (2002-07-26), pages 26733-26740, XP002964542</p> <p>ISSN: 0021-9258</p> <p>le document en entier</p>	1-12
A	<p>CARTRON GUILLAUME ET AL: "Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene"</p> <p>BLOOD,</p> <p>vol. 98, no. 11 Part 1,</p> <p>16 novembre 2001 (2001-11-16), page 602a, XP001193741</p> <p>&amp; 43RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, PART 1; ORLANDO, FLORIDA, USA; DECEMBER 07-11, 2001</p> <p>ISSN: 0006-4971</p> <p>le document en entier</p>	1-12
A	<p>US 6 180 377 B1 (BODMER MARK WILLIAM ET AL) 30 janvier 2001 (2001-01-30)</p> <p>colonne 1</p>	1-12
A	<p>VIDOVIC D ET AL: "SELECTIVE APOPTOSIS OF NEOPLASTIC CELLS BY THE HLA-DR-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY"</p> <p>CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US,</p> <p>vol. 128, no. 2,</p> <p>19 juin 1998 (1998-06-19), pages 127-135, XP000857331</p> <p>ISSN: 0304-3835</p> <p>page 134, colonne de gauche</p>	1-12

-/--

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P,X	<p>SHINKAWA T ET AL: "The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 278, no. 5, 31 janvier 2003 (2003-01-31), pages 3466-3473, XP002965857 ISSN: 0021-9258 page 3466, colonne de gauche page 3471, colonne de gauche, dernier alinéa - page 3473, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>-----</p>	1-12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Formule internationale No  
PCT/03/02714

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0177181	A1	18-10-2001	FR 2807767 A1	19-10-2001
			AU 5485801 A	23-10-2001
			CA 2406033 A1	18-10-2001
			EP 1272527 A2	08-01-2003
			WO 0177181 A2	18-10-2001
			JP 2003534781 T	25-11-2003
			US 2003175969 A1	18-09-2003
US 6180377	B1	30-01-2001	AT 208820 T	15-11-2001
			AU 691811 B2	28-05-1998
			AU 6934194 A	03-01-1995
			AU 694926 B2	06-08-1998
			AU 6934294 A	03-01-1995
			CA 2163344 A1	22-12-1994
			CA 2163345 A1	22-12-1994
			DE 69429095 D1	20-12-2001
			DE 69429095 T2	12-09-2002
			EP 0714409 A1	05-06-1996
			EP 0715653 A1	12-06-1996
			WO 9429351 A2	22-12-1994
			WO 9429451 A2	22-12-1994
			JP 8511420 T	03-12-1996
			JP 8511421 T	03-12-1996